

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2021

課題番号：17KT0009

研究課題名(和文) 一分子計測による大自由度分子系の反応経路の多様性と遷移状態アンサンブルの直接観測

研究課題名(英文) Direct observation of multiple reaction pathway and transition state ensembles in molecular systems having large degree of freedom by single molecule measurements

研究代表者

迫田 憲治 (Sakota, Kenji)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80346767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小液滴に溶存したタンパク質(大自由度分子系)からの蛍光を高感度に計測することを目的として以下の研究を行った。(1) 先行研究で用いられてきた液滴捕捉用電極を用いた場合、光捕集の立体角を大きくすることができず、蛍光の高感度計測を難しくしていた。我々が今回開発したエンドキャップトラップを用いることで、微小液滴から放出される蛍光を、従来に比べて約80倍高感度に計測した。(2) 液滴に照射した励起光が液滴内部に閉じ込められることに起因する蛍光増強効果を観測した。これにより、イオントラップの改良による蛍光検出感度の向上とあわせると、従来法と比べ約3桁の感度向上を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光検出は、測定対象を「その場」で「非破壊的に」観測できる有力な手段である。本研究では、光共振器として振る舞う単一微小液滴を上手く利用することにより、蛍光検出感度の更なる向上を達成した。この方法をタンパク質のような大自由度分子系に適用することによって、これまで感度不足のために計測することができなかった分子系の振る舞いを明らかにすることが可能となり、大自由度分子系が示す複雑なダイナミクスを分子レベルで理解するための基礎データを取得することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：The following studies were conducted to measure fluorescence from proteins dissolved in microdroplets with high sensitivity. (1) The electrode for droplet trapping used in the previous studies cannot increase the solid angle of light collection, which makes it difficult to measure fluorescence with high sensitivity. The fluorescence emitted from microdroplets was measured 80 times more sensitively by using the end-cap trap we have developed in this study. (2) We observed the fluorescence enhancement effect caused by the confinement of the excitation light irradiated on the droplet inside the droplet. The sensitivity was improved by about three orders of magnitude compared with the conventional method, together with the improvement of the sensitivity of fluorescence detection by the improvement of the ion trap.

研究分野：光物理化学

キーワード：微小液滴 タンパク質 イオントラップ

### 1. 研究開始当初の背景

遷移状態の概念を中心に据えた従来の化学反応論では、「化学反応には特定の経路が存在し、その経路に対する反応座標を一義的に定義できる」と考えている。しかしながら、たとえば、タンパク質の折り畳みでは、自由エネルギー曲面が天然構造に向かって漏斗(ファネル)のような形状をしているため、特定の有利な経路は存在せず、様々な折り畳み経路(つまり、多様な反応経路)を通ることによって天然構造に素早く折り畳まれると考えられている。つまり、内部自由度の大きな分子系がファネル形状の自由エネルギー曲面をもっている場合、「化学反応には特定の経路が存在する」という従来の考え方は破綻する。この場合、1つの反応経路(合成経路)を精緻に設計するという発想も意味を失う。

今後、単純な化学反応を超えて、大自由度分子系の化学反応を理解し制御するには、従来とは異なる概念が必要になる。タンパク質のような大自由度分子系では、自由度が大きいゆえに反応の効率や選択性を決める自由エネルギー障壁においてエントロピー(反応経路の多様性)が重要になるはずである。大自由度分子系における反応経路の多様性を直接実証するには、たとえば、タンパク質の折り畳み過程を一分子計測で追跡し、個々のタンパク質の構造変化経路をそれぞれ比較することで、その違いを明らかにすればよい。しかし現状では、蛍光を用いた一分子計測の時間分解能はマイクロ秒程度の遅い時間領域に留まっている(解析に必要な光子数を得るのにマイクロ秒程度が必要なためである)。よって、これまでに行われてきた一分子計測実験ではタンパク質のような大自由度分子系の構造変化経路の全貌を明らかにできていない。大自由度分子系の一分子計測を大きく進展させるには、これまでとは全く異なった考えに基づくアプローチが必要である。

### 2. 研究の目的

分子からの自然放出(蛍光)は、量子化された電磁場と分子との相互作用の結果であり、自然放出速度は分子に固有の物理量だと考えられている。しかし、微小な光共振器中では、量子化された電磁場の状態密度分布がマクロな自由空間と比べて大きく変化するため、そのなかにおかれた分子の自然放出速度は増強されることが量子光学分野の研究から明らかにされている(パーセル効果)。直径が数~数十 $\mu\text{m}$ の微小液滴内で生じた蛍光が液滴界面で全反射を繰り返すと、蛍光は液滴内部に閉じ込められ、光の定在波が形成される。つまり、微小液滴は微小な光共振器と見なすことができる。上述のパーセル効果によって自然放出速度が速くなれば、単位時間当たりに観測できる光子数も増大するはずである。よって、微小液滴に溶存した分子を計測対象に出来れば、蛍光の検出感度にブレークスルーを起こせる可能性がある。そこで本研究では、我々が独自に展開している3次元イオントラップ技術を用いた単一微小液滴の空間捕捉とレーザー顕微分光を進展させることによって、液滴内に溶存したタンパク質(大自由度分子系)の高感度蛍光計測を実現する。

### 3. 研究の方法

図1に空間捕捉した単一微小液滴に対する蛍光測定に用いた光学系全体の概要図を示す。エレクトロスプレー法を用いて生成した帯電微小液滴を断熱チャンバー内に設置したエンドキャップトラップ(イオントラップ)で空間捕捉した。エンドキャップトラップの電極には、液滴捕捉のための正弦波電圧(2500-3500 Hz, 1000-1250 V<sub>pp</sub>)を印加している。励起光源はピコ秒パルスレーザー(LDH-D-TA-530B, PICOQUANT)を用いた。ピコ秒パルスレーザーはシングルモードファイバーに通して円形ビーム(TEM<sub>00</sub>モード)にした。バンドパスフィルターとNDフィルターを通過後、偏光板に通し、アクロマティックレンズ(AC254-100-A, Thorlabs)を用いて縦偏光の励起光を空間捕捉した液滴全体に集光した。溶存分子からの蛍光は対物レンズ(CFI TU Plan EPI ELWD 100x, Nikon, N.A.0.8, W.D. 4.5 mm)を用いて捕集した。捕集した光は偏光無依存ビームスプリッター(CCM5-BS016/M, Thorlabs)を用いて均等に分割し、片方はロングパスフィルターを通過後、イメージング測定用冷却 CCD カメラ(BITRAN, BU-61M)に結像した。もう一方は、ダイクロイックミラーとアクロマティックレンズ( $f=170\text{ mm}$ , シグマ光機), およびロングパスフィルターを通過後、冷却 CCD 付分光器(iHR 550+Symphony, 堀場製作所)に集光した。これにより、イオントラップに捕捉している微小液滴の蛍光顕微画像と蛍光スペクトルの同時連続測定を実現している。

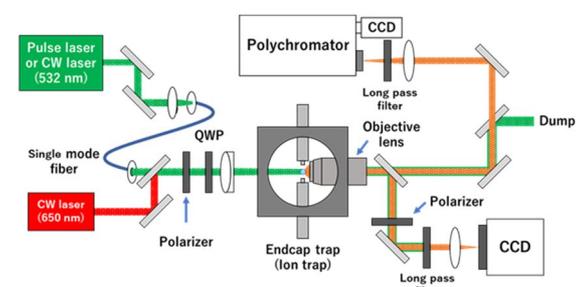


図1. 今回開発した単一微小液滴捕捉-レーザー蛍光顕微鏡の概略図

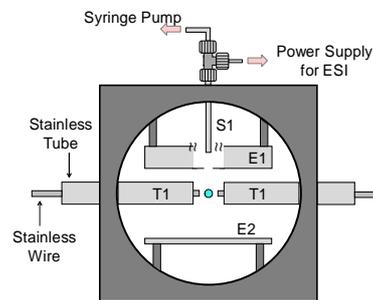
#### 4. 研究成果

##### (1) 微小液滴から放出される蛍光の高感度検出を目指したイオントラップの開発

荷電微小液滴の空間捕捉に関しては、すでに多くの先行研究が存在するが、そのほとんどは Wolfgang Paul によって開発された四重極イオントラップ (Paul トラップ)、もしくは Paul トラップの電極構造を簡略化したトラップを用いて微小液滴を空間捕捉している。しかしながら、これらのイオントラップを用いて捕捉した液滴に蛍光分光やラマン分光を行う際、常につきまとう問題があった。それは、トラップを構成する電極の構造上、光を捕集するための対物レンズを液滴に近づけることが難しいことである。そのため、光捕集の立体角が小さくなってしまい、蛍光の高感度計測が著しく困難になっていた。

我々はこの困難を解決するために、原子イオンのレーザー冷却用に開発されたエンドキャップトラップを用いて液滴を空間捕捉することにした。その構造を図 2 に示す。エンドキャップトラップの電極は、2本の細長いステンレス線 (直径 0.7 mm) から構成されている (図 2 の T1)。この細い電極を 1.8 mm 離して対向させ、電極に正弦波電圧を印加することによって捕捉電位を形成している。荷電微小液滴は、捕捉電位が形成されている電極間に安定に捕捉できる。

今回開発したエンドキャップトラップを含む顕微分光装置で測定した、単一微小液滴からの蛍光スペクトルを図 3 に示す。図 3 の「平行平板型」は、従来用いられてきた Paul トラップ (正確にはその簡易構造型) を用いて測定した蛍光スペクトルである。捕捉した液滴 (直径はともに 3.8  $\mu\text{m}$ ) には蛍光色素 (ローダミン B) が溶存している。図 3 から明らかなように、観測されている蛍光強度はエンドキャップトラップを用いて測定した場合の方が圧倒的に強いことがわかる。図 3 の実験条件では、約 80 倍の蛍光検出感度の向上に成功している。



SIDE VIEW

図 2. エンドキャップトラップの概略図

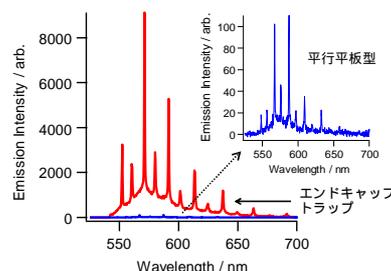


図 3. エンドキャップトラップを用いて測定した蛍光スペクトル

##### (2) 励起光共鳴による蛍光増強効果の観測

大気中に空間捕捉した微小液滴は光共振器として振る舞うことが知られている。これは液滴を取り囲む空気と液滴との屈折率が異なるため、液滴の気液界面で光が全反射するためである。このことを利用すれば、外部から照射した励起光を液滴内部に閉じ込めることによって、実効的な励起光強度を大きくすることができるため、液滴から放出される蛍光強度を増強できる。

図 4 は液滴から放出される蛍光強度の液滴径依存性に関するプロットである (溶存色素はローダミン B)。横軸は液滴の直径 (および対応するサイズパラメータ)、縦軸は蛍光強度である。図 4 から液滴径が特定の値を取るとき、蛍光強度が増強されていることがわかる。とくに液滴径が約 3.34  $\mu\text{m}$  のとき、蛍光強度は約 10 倍に増強されている。これは、液滴がある特定の直径をとったとき、液滴の外周長が励起光の波長の整数倍と一致したとき、励起光が液滴内に強く閉じ込められること (励起光が共鳴すること) が原因である。つまり、この励起光共鳴を利用すれば、液滴に溶存した分子からの蛍光を高感度に観測できることを明らかにした。(1) で記した、イオントラップの改良による蛍光検出感度の向上とあわせると、従来法と比べ約 3 桁の感度向上を達成した。

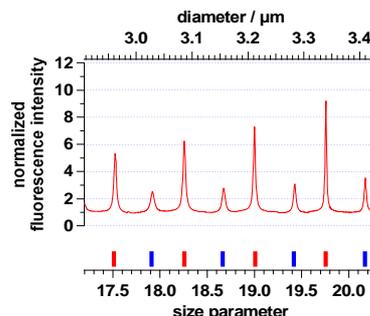


図 4. 液滴から観測される蛍光強度の液滴径依存性

また、Alexa Fluor 532 で色素標識したシトクロム c についても同様の実験を行ったところ、ローダミン B のときと同様の実験結果が得られたが、色素分子 (Alexa Fluor 532) の光退色がバルク溶液のときと比べて早くなっていたため、現時点では、液滴に溶存した色素標識シトクロム c の長時間蛍光計測には成功していない。

一方、時間相関単一光子計数法を用いて、空間捕捉した微小液滴から放出される蛍光の寿命を測定した。先行研究ではパーセル効果による蛍光放出速度の加速 (10 倍程度) が報告されていた系と同一の系に対して実験を行ったところ、先行研究とは全く異なり、バルク溶液とほとんど変わらない蛍光寿命が得られた。よって、パーセル効果による蛍光放出速度の加速を利用することによって蛍光検出感度を上げることは、現在までのところ達成できていない。この原因の詳細については分かっていないが、いまのところ、液滴内における溶存分子の分子配向効果がパーセル効果を妨げる方向に働いているのではないかと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mio Harada, Shunsuke Yamamoto, Tomoyuki Yatsuhashi, Kenji Sakota	4. 巻 536
2. 論文標題 Cooperative dissociation of J-aggregates into monomers in the 2- isobutoxyethanol/water binary solvent with the lower critical solution temperature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 110817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemphys.2020.110817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nobuyuki Nakashima, Tomoyuki Yatsuhashi, Kenji Sakota, Izumi Iwakura, Sena Hashimoto, Keiichi Yokoyama, Shohei Matsuda	4. 巻 752
2. 論文標題 An electron-capture efficiency in femtosecond filamentation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 137570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cplett.2020.137570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Okamoto, T. Nakamura, R. Kihara, T. Asahi, K. Sakota, T. Yatsuhashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Synthesis of Bare Iron Nanoparticles from Ferrocene Hexane Solution by Femtosecond Laser Pulses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemPhysChem	6. 最初と最後の頁 2480-2485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cphc.201800436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mitsuhiko Miyazaki, Ayumi Naito, Takamasa Ikeda, Johanna Klyne, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya, Otto Dopfer, Masaaki Fujii	4. 巻 20
2. 論文標題 Real-time observation of the photoionization-induced water rearrangement dynamics in the 5-hydroxyindole-water cluster by time-resolved IR spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 3079-3091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C7CP06127G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takamasa Ikeda, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya	4. 巻 121
2. 論文標題 Elevation of the Energy Threshold for Isomerization of 5-Hydroxyindole-(tert-butyl alcohol) <sub>1</sub> Cluster Cations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. A	6. 最初と最後の頁 5809-5816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.7b05434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 原田美緒, 山本駿介, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 超分子J会合体の溶液内蛍光イメージング
3. 学会等名 分子科学会オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白山拓実, 原田美緒, 三宅宏典, 中島洋, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 リポソームに内包されたタンパク質の構造安定性および空間分布に関する蛍光イメージング評価
3. 学会等名 分子科学会オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井航汰, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 単一微小液滴で生じる分子配向に起因する蛍光増強の観測
3. 学会等名 分子科学会オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田美緒, 山本駿介, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 溶液中における超分子J会合体の蛍光イメージングと配列度の評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀井航汰, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 光閉じ込め効果を用いた単一微小液滴における分子配向効果の観測
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Fluorescence enhancement caused by the excitation light confinement in a single microdroplet
3. 学会等名 Manchester International Symposium: Highly-excited States and Non-covalent Interactions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 The cavity mode dependent confinement of excitation light in a single levitated microdroplet
3. 学会等名 The 23th East Asian Workshop on Chemical Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 A single droplet microscopy for highly sensitive fluorescence detection
3. 学会等名 WRHI International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Microscopy of a single levitated microdroplet for biomolecular applications
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 単一微小液滴で生じる励起光の閉じ込めに起因した蛍光増強とその液滴径依存性
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口昌起, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 平行平板型イオントラップとエンドキャップトラップの性能比較
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Noguchi, Motoya Sano, Tomoyuki Yatsunami, Kenji Sakota
2. 発表標題 Performance comparison with a parallel plate iontrap and an endcap iontrap
3. 学会等名 International Workshop on Quantum Sensing & Biophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoya Sano, Tomoyuki Yatsunami, Kenji Sakota
2. 発表標題 Development of a small endcap trap for laser microscopy in a single levitated microdroplet
3. 学会等名 34th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 小型エンドキャプトラップの製作と微小液滴が示す励起光共鳴に起因した蛍光増強効果の観測
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 空間捕捉した単一微小液滴が示す励起光共鳴に起因した蛍光増強効果の液滴サイズ依存性
3. 学会等名 第99回日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Laser spectroscopy of a single levitated microdroplet ~Lasing and resonance energy transfer~
3. 学会等名 International Symposium on "Diversity of Chemical Reaction Dynamics" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 迫田憲治
2. 発表標題 単一微小液滴の顕微分光とバルク溶液中におけるキラルJ会合体の研究
3. 学会等名 第40回溶液化学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobuaki Nakashima, Tomoyuki Yatsunami, Kenji Sakota, Izumi Iwakura, Keiichi Yokoyama
2. 発表標題 Laser chemistry for Eu recovery
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安富翔太, 佐野元哉, 山本駿介, 大谷拓也, 関谷博, ハツ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 空間捕捉した単一微小液滴のレーザー顕微分光
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大谷拓也, 三宅弘之, ハツ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 両親媒性シアニン色素のキラルJ会合体形成における混合溶媒の組成比依存性
3. 学会等名 第40回溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関